DOI: 10.48305/jims.v41.i738.0872

مجله دانشکده پزشکی اصفهان — سال چهل و یکم/شماره‌ی ۷۳۸/هفته‌ی دوم آذر ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱ — تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۹/۴ — تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۹/۱۴

طراحی و ساخت واکسن خوراکی مبتنی بر *لاکتوکوکوس لاکتیس* نوترکیب بیان کننده‌ی پروتئین سیتوپلاسمی لومازین سنتاز علیه *بروسلا آبورتوس*

زهرا فاتحی[۱]، عباس دوستی[۲]، محمد سعید جامی[۳،۱]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: واکسیناسیون، یکی از مؤثرترین و اقتصادی‌ترین روش‌ها برای کنترل بروسلوز می‌باشد. هدف از این پژوهش، ایجاد باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* نوترکیب بیان‌کننده پروتئین سیتوپلاسمی لومازین سنتاز (Brucella lumazine synthase) BLS *بروسلا آبورتوس* می‌باشد.

روش‌ها: در این مطالعه، وکتور مورد نظر به همراه ژن و سیگنال پپتید (pNZ8148-Usp45-*BLS*) طراحی و سنتز گردید. به منظور تأیید صحت کلونینگ از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction) PCR، هضم آنزیمی و توالی‌یابی استفاده شد. سپس وکتور بیانی نوترکیب به باکتری *اشریشیاکلی* سویه *Top10 F* ترانسفورم شد. باکتری‌های ترانسفورم شده که بر روی پلیت آگار حاوی کلرامفنیکل رشد کرده بودند، انتخاب شده و با استفاده از کیت استخراج پلاسمید ستونی، استخراج انجام شد. با استفاده از تکنیک الکتروپوریشن، وکتور نوترکیب درون باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* ترانسفورم شد. به منظور تأیید ترانسفورماسیون از تکنیک ژل الکتروفورز عمودی (Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis = SDS-PAGE) و (Reverse transcription polymerase chain reaction) RT-PCR استفاده شد.

یافته‌ها: هضم آنزیم، PCR و توالی‌یابی به منظور تأیید کلونینگ ژن *BLS* در وکتور pNZ8148 انجام شد. مشاهده‌ی قطعه‌ی ژنی *BLS* با طولی برابر ۴۷۷ جفت باز و قطعه پلاسمید pNZ8148 - Usp45 فاقد قطعه‌ی ژنی *BLS* با طول ۲۹۹۷ جفت باز،کلون‌سازی قطعه‌ی ژنی *BLS* تأیید شد. نتایج توالی‌یابی توسط شرکت Generay ارسال شد. همچنین در بررسی انجام شده توسط دستگاه نانودراپ غلظت پلاسمید استخراج شده ۸۴۸/۹ ng/µl و درجه‌ی خلوص ۲/۰۷ برآورد شد. نتایج حاصل از RT-PCR حاکی از موفقیت در ترانسفورماسیون ژن *BLS بروسلا آبورتوس* در باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* بود. نتایج حاصل از SDS-PAGE حاکی از وجود تک باند ۱۸ کیلودالتونی پروتئین BLS بود.

نتیجه‌گیری: پژوهش حاضر نشان داد که ژن BLS باکتری پروبیوتیک *لاکتوکوکوس لاکتیس* ترانسفورم شده با pNZ8148-Usp45-*BLS* به روش الکتروپوریشن، بیان می‌شود.

واژگان کلیدی: بروسلوزیس؛ DNA واکسن؛*لاکتوکوکوس لاکتیس*؛ الکتروپوریشن

ارجاع: زهرا فاتحی، عباس دوستی، محمد سعید جامی. **طراحی و ساخت واکسن خوراکی مبتنی بر *لاکتوکوکوس لاکتیس* نوترکیب بیان کننده‌ی پروتئین سیتوپلاسمی لومازین سنتاز علیه *بروسلا آبورتوس*.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۲؛ ۴۱ (۷۳۸): ۸۸۳-۸۷۲

مقدمه

با توجه به آسیب‌های ناشی از بیماری تب مالت در صنعت دامپروری و افزایش نگرانی‌ها در مورد بهداشت عمومی، در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی در زمینه‌ی کنترل و پیشگیری از این بیماری صورت گرفته است. پیشگیری از این بیماری عمدتاً از طریق واکسیناسیون دام‌ها، معدوم نمودن دام‌های آلوده و نیز پاستوریزاسیون محصولات لبنی صورت می‌پذیرد (۱). پاک‌سازی باکتری‌های داخل سلولی به عملکرد ایمنی سلولار CMI (Cell mediated immunity) و تولید سایتوکاین‌های مؤثر مانند INF-γ و ایمنی هومورال HMI (Humoral mediated immunity) بستگی دارد. لذا پژوهشی

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲- استاد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۳- استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: عباس دوستی: استاد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

Email: abbasdoosti@yahoo.com

مبتنی بر ساخت واکسنی مؤثر و کارآ که بتواند منجر به القای هر دو پاسخ سیستم ایمنی هومورال و سلولار بشود، امری ضروری به نظر می‌رسد (۲).

واکسن‌های زنده ضعیف شده مانند S19، RB51 و Rev 1 که به منظور کنترل بیماری در حیوانات اهلی استفاده می‌گردند، می‌توانند به طور مؤثری پاسخ‌های ایمنی سلولی (CMI) را در برابر بروسلوز القاء نمایند (۳). با این حال استفاده از این واکسن‌ها دارای معایبی متعددی بوده و تا ایده‌آل بودن، فاصله‌ی زیادی را دارند (۳). برای مثال استفاده از این واکسن‌ها منجر به سقط جنین در دوران بارداری گشته و همچنین به دلیل دارا بودن لیپوپلی ساکارید (Lipopolysaccharide) LPS سبب بروز اختلالات سرولوژیک در روش‌های تشخیصی شده و موجب ایجاد بیماری در انسان می‌گردند، لذا تجویز آن برای انسان ممنوع است (٤). از این‌رو بازنگری در طراحی واکسن علیه بروسلوز، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد، که به این منظور پی بردن به خواص آنتی‌ژنیک و شیمیایی انواع آنتی‌ژن‌های بیان شده در این باکتری و همچنین انتخاب سیستم انتقال مناسب واکسن، از جمله مواردی هستند که در توسعه‌ی واکسن کارآ حائز اهمیت می‌باشند.

بروسلا لومازین سنتاز (BLS (Brucella lumazine synthase پروتئینی بسیار ایمنی‌زا است که دارای خواص ادجوانتی بوده و به عنوان یک حامل پروتئین مؤثر برای ساخت واکسن پیشنهاد می‌گردد (۵). مطالعات نشان می‌دهند که این پروتئین سیتوپلاسمی ۱۸ کیلو دالتونی *بروسلا* می‌تواند برای تشخیص سرولوژیک بروسلوز انسانی و حیوانی استفاده گردد (٦). همچنین مطالعات حاکی از آن است که ایمن سازی با لومازین سنتاز، آنزیم دخیل در بیوسنتز ریبوفلاوین، در غیاب ادجوانت می‌تواند سبب القاء تیتر بالایی از آنتی‌بادی‌ها گردد که این امر نشان‌دهنده‌ی ایمنی‌زا بودن این پروتئین می‌باشد (٦). ایمن‌سازی با DNAپلاسمید کدکننده‌ی آنتی‌ژن مورد نظر، روشی جدید و امیدوارکننده در تحقیق و توسعه‌ی واکسن است. تعدادی از مطالعات نشان داده‌اند که پس از ایمن‌سازی مدل‌های آزمایشگاهی با آنتی‌ژن *BLS*، این آنتی‌ژن به طور طبیعی پردازش شده و بر روی مولکول‌های اصلی مجتمع سازگاری بافتی کلاس I و کلاس II ارائه می‌شود و پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال را القا می‌نماید. *BLS* همچنین به عنوان یک سیستم انتقال آنتی‌ژن با خاصیت ایمنی‌زایی ذهانی شناخته شده است (٦).

عفونت با *بروسلا*، معمولاً از طریق سطوح مخاط سیستم گوارشی رخ می‌دهد. لذا، تجویز واکسن‌های مخاطی می‌تواند برای کنترل بروسلوز در محل ورود پاتوژن مؤثر باشد. همچنین، واکسن‌های مخاطی می‌توانند بدون نیاز به روش‌های تجویز تهاجمی بطور مؤثری هر دو پاسخ های ایمنی سلولی و هومورال را در محل مخاط و سطح سیستمیک القاء نمایند (۷). رویکردهای جدید در طراحی واکسن مبتنی بر شناسایی و انتخاب آنتی‌ژن‌هایی است که بیشترین نقش را در ایجاد بالاترین سطح از ایمنی داشته باشند (۸). محدودیت‌های پلت‌فرم‌های سنتی واکسن مانند پاتوژن‌های زنده‌ی ضعیف شده، غیرفعال شده و همچنین واکسن‌های زیرواحدی منجر به کشف و توسعه‌ی فناوری‌های جدید در طراحی و تولید واکسن شده است. امروزه پیشرفت‌های اخیر در علم بیوتکنولوژی و شناخت مکانیسم‌های دخیل در سیستم ایمنی، امکان طراحی ساخت سیستم‌های واکسن حامل و واکسن‌های ژنی را به محققان می‌دهد (۹). باکتری‌های اسید لاکتیک (Lactic acid bacteria) LAB برای چندین سال به‌عنوان سیستم‌های انتقال بالقوه و یا ادجوانت به منظور ساخت واکسن مخاطی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۱۰). مطالعات نشان می‌دهند که *لاکتوکوکوس لاکتیس* (*L. lactis*) به عنوان مدلی از باکتری‌های *اسید لاکتیک*، غیر بیماری‌زا و غیر تهاجمی بوده و می‌توانند به منظور غلبه بر معایب استفاده از سویه‌های ضعیف شده *بروسلا آبورتوس* به عنوان یک سیستم انتقال آنتی‌ژن امیدوارکننده برای ایمن‌سازی مخاط در نظر گرفته شوند (۱۰). از این‌رو هدف از این مطالعه، بیان پروتئین *BLS* با استفاده از باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* به عنوان ناقل می‌باشد.

روش‌ها

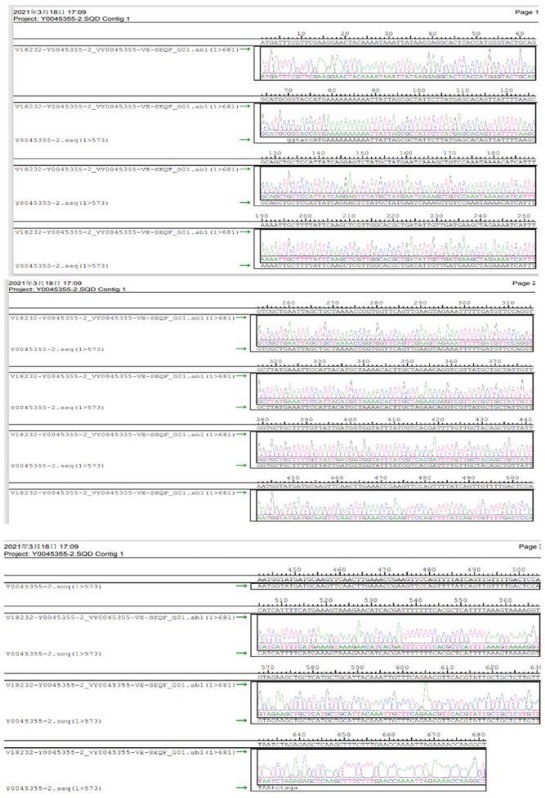
سویه‌های باکتریایی و محیط‌های کشت: در این مطالعه از باکتری‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* و *اشرشیاکلی* استفاده شد. جزئیات مربوط به سویه‌های مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ مشخص شده است. به منظور کشت باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* ترانسفورم شده از محیط کشت M17 broth (Quelab، کانادا) استفاده شد. همچنین کشت *اشرشیاکلی* سویه‌ی Top 10F در محیط LB broth (L3022) (Merck، آلمان) در دمای ۳۷ °C و با استفاده از انکوباتور شیکردار (۲۰۰ rpm) انجام شد. در تهیه محیط‌های جامد بصورت پلیت از محیط آگار میکروبیولوژی (Merck، آلمان) به نسبت ۱/۵ درصد به هر یک از محیط‌های فوق افزوده شد.

جدول ۱. سویه‌های باکتریایی مورد استفاده در مطالعه

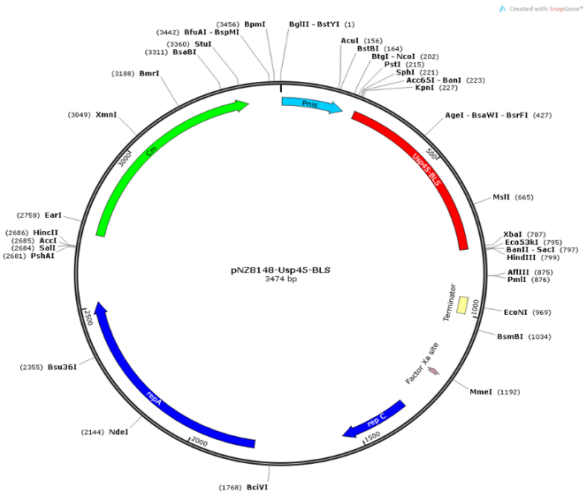
نام باکتری	سویه باکتری	رفرنس
لاکتوکوکوس لاکتیس	PTCC1336	مرکز منطقه‌ای کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی، ایران
اشرشیاکلی	Top 10F	مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد
بروسلا آبورتوس	544	مؤسسه‌ی رازی تهران

طراحی و سنتز وکتور بیانی: پژوهش حاضر از نوع تجربی بوده و روش گردآوری اطلاعات از نوع مطالعات کتابخانه‌ای و تجربیات آزمایشگاهی می‌باشد. در گام نخست با استفاده از مطالعات بیوانفورماتیک و پایگاه اطلاعاتی NCBI، توالی ژنی BLS به عنوان یک آنتی‌ژن ایده‌آل به عنوان کاندیدا برای ساخت واکسن نوترکیب پروبیوتیک خوراکی علیه بروسلوزیس انتخاب شد. سپس قدرت آنتی‌ژنسیته، سمیت و آلرژی‌زایی این پروتئین با استفاده از پایگاه‌های داده‌های بیوانفورماتیک مانند VaxiJen، ToxinPred و AllergenFP v.1.0 بررسی شد. اطلاعات مربوط به وکتور بیانی مبتنی بر نایسین pNZ8148 از سایت Addgene استخراج شد و با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner جایگاه برش آنزیم‌های محدودگر انتخاب شد (شکل ۱ ب). وکتور بیانی pNZ8148 حاوی یک مبدأ همانندسازی (Ori)، ژن مقاومت به کلرامفنیکل، دو ژن برای پروتئین‌های تکثیر repA و repC، پروموتر القایی توسط نایسین (P nisA)، و پایان‌دهنده‌ی رونویسی (T) است. این وکتور برای بیان توالی‌های کلون شده در باکتری‌های گرم مثبت به خصوص گونه‌های باکتری‌های *لاکتیک* طراحی شده است. این وکتور بیانی ۳۱۶۷ جفت باز دارد. قطعه‌ی ژنی BLS با کد دسترسی Q2YKV1.1 به طول ٤٧٧bp همراه یک توالی سیگنال پپتید ۲۷aa بنام Usp45 با کد دسترسی ABY84357 انتخاب و سازواره نهایی طراحی شد. در نهایت ژن به همراه سیگنال پپتید (Usp45-*BLS*) به صورت سنتتیک در وکتور مبتنی بر نایسین pNZ8148 در میان جایگاه‌های برشی *Kpnl* و *Xbal* توسط شرکت Generay چین، کلون گردید. سپس وکتور نوترکیب pNZ8148 - Usp45- *BLS* با اندازه‌ی ٣٤٧٤ جفت باز ساخته شد.

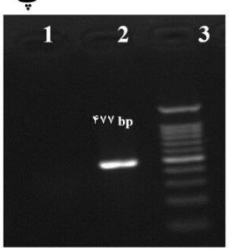
الف



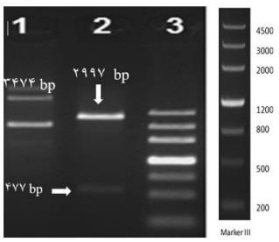
ب



پ



ت



شکل ۱. نتایج حاصل از محل کلونینگ در وکتور pNZ8148 و تأیید کلونینگ قطعه‌ی ژنی *BLS* با روش PCR، هضم آنزیمی و توالی‌یابی. الف) نتایج حاصل از تعیین توالی ژن *BLS* که توسط شرکت Generay انجام پذیرفت. ب) تصویر شماتیک محل کلونینگ در وکتور pNZ8148 میان جایگاه‌های برشی *KpnI* و *XbaI*. کلونینگ در این محل سبب بیان پروتئین هدف در سطح سلول خواهد شد. پ) تأیید صحت حضور قطعه‌ی ژنی *BLS* با طول ٤٧٧ جفت باز با روش PCR. لاین ۱) کنترل منفی، لاین ۲) قطعه‌ی ژنی ٤٧٧ جفت بازی پروتئین BLS، لاین ۳) نشانگر Marker III . ت) نتایج حاصل از هضم آنزیمی با دو آنزیم محدودگر *KpnI* و *Xbal* . لاین ۱) باند ٣٤٧٤ جفت بازی مربوط به وکتور pNZ8148-Usp45-*BLS*، لاین ۲) هضم آنزیمی پلاسمید pNZ8148-Usp45-*BLS* و مشاهده‌ی قطعه‌ی ژنی ۲۹۹۷ جفت بازی و ٤٧٧ جفت بازی. لاین ۳) نشانگر ۱۰۰ جفت بازی (سینا ژن، ایران).

جدول ۲. توالی‌های الیگونوکلئوتیدی مربوط به ژن *BLS*.

Gene name	Sequence 5 to 3	Tm	Product length
BLS-F	5–ATGAATCAAAGCTGTCCAAATAAAAC–3	52.5 ºC	477 bp
BLS-R	5^{i}–TTAAACAAGAGCAGCAATACGTGAAC–3^{i}	52.5 ºC	

تأیید کلونینگ ژن BLS درون وکتور pNZ8148: به منظور تأیید صحت کلونینگ انجام شده از تکنیک‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، هضم آنزیمی و توالی‌یابی استفاده شد. PCR برای ژن BLS با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و برنامه‌ی دمایی مشخص انجام شد و محصول PCR با استفاده از ژل آگارز، الکتروفورز شد. وکتور نوترکیب بیانی تحت هضم با دو آنزیم محدودگر *KpnI* و *XbaI* (GENEray، چین) قرار گرفتند. همچنین محصول واکنش آنزیمی بر روی ژل الکتروفورز ۱ درصد بارگذاری شدند. توالی‌یابی نوکلئوتیدی وکتور نوترکیب توسط شرکت GENEray انجام و داده‌های آن برای ما ارسال شد.

مستعدسازی و ترانسفورماسیون اشرشیاکلی سویه Top10 F: به منظور مستعدسازی *اشرشیاکلی* سویه Top10F از روش استاندارد کلرید کلسیم (CaCl2) بر مبنای روش کار Cohen و همکاران استفاده شد (۱۱). پس از سنجش میزان رشد باکتری‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Jenway، انگلستان)، رسوب باکتریایی با بافر کلسیم کلراید (۰/۱ میلی مولار) سرد و استریل در دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد به حالت سوسپانسیون درآمد. سپس جهت ترانسفورماسیون، مقدار ۱۰ میکرولیتر (غلظت ۰/۲ میکروگرم/میکرولیتر) از وکتور نوترکیب بیانی وابسته به القا توسط نایسین *BLS* - Usp45- pNZ8148 به ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلول‌های باکتریایی مستعد (۰/۳ = OD ٦۰۰) افزوده شد. در مرحله‌ی بعد باکتری‌های مستعدی که وکتور نوترکیب به آن‌ها اضافه شده بود، تحت یک شوک حرارتی ٤۲ درجه‌ی سانتی‌گرادی به مدت ۹۰ ثانیه و بلافاصله یک شوک سرد ٤ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ٤ دقیقه قرار گرفتند. در نهایت پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ °C درجه‌ی سانتی‌گراد، سلول‌های باکتریایی ترانسفورم شده بر روی پلیت LB agar (Merck، آلمان) حاوی کلرامفنیکل (۲۵ mg/µl) کشت داده شدند.

تأیید ترانسفورماسیون در باکتری اشرشیاکلی سویه Top10F: به منظور تأیید ترانسفورماسیون وکتور نوترکیب به باکتری *اشرشیاکلی* سویه Top10F، استخراج و خالص‌سازی وکتور نوترکیب به کمک کیت ستونی Plasmid Extraction Mini Kit (FAVORGEN، تایوان) انجام پذیرفت. با استفاده از loading Buffer (پارس توس، ایران) و مارکر، حضور وکتور روی ژل آگارز ۱ درصد تأیید شد. سپس غلظت پلاسمیدهای استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (ThermoScientific، آمریکا) خوانده شد. کلون‌های نوترکیب باکتری *اشرشیاکلی* با انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) روی محصولات استخراج پلاسمید ارزیابی و تأیید شدند. الیگونوکلئوتیدهای اختصاصی جهت تکثیر ژن *BLS* به اندازه‌ی ٤۷۷ جفت باز به صورت جلوبرنده و برگشت با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner version 3.05 طراحی گشت و سنتز آن توسط شرکت سیناژن صورت پذیرفت (جدول ۲). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر حاوی ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR ۱۰x (یکتا تجهیز آزما، ایران)، ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$ (یکتا تجهیز آزما، ایران)، ۲۰۰ میکرومولار dNTPs (یکتا تجهیز آزما، ایران)، ۱۰۰ نانومولار از هر یک از پرایمرها (سیناژن، ایران)، ۱۰۰ نانوگرم از DNAی وکتوری و ۱ واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq (یکتا تجهیز آزما، ایران) در دستگاه ترمال سایکلر (اپندورف، آلمان) انجام پذیرفت. برنامه‌ی دمایی دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) جهت انجام PCR در جدول ۳ ذکر شده است. همچنین الکتروفورز محصولات استخراج پلاسمید مربوط به کلون‌های نوترکیب *اشرشیاکلی* بر روی ژل آگارز ۱ درصد انجام گردید. به منظور بررسی آمپلیکون‌های سنتز شده در PCR، از الکتروفورز ژل آگارز در بافر TBE 10X استفاده گردید. در نهایت از دستگاه عکس‌برداری از ژل (UV1Tech، انگلستان)، جهت مشاهده و ثبت تصویر ژل استفاده شد.

جدول ۳. شرایط دمایی استفاده شده در واکنش PCR.

مرحله	دما (درجه سیلسیوس)	زمان	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	۹۵	۵ دقیقه	۱
واسرشت	۹۵	۶۰	۳۰
اتصال	۵۲/۵	۶۰	۳۰
بازآرایی (گسترش)	۷۲	۶۰	۳۰
بازآرایی نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

مستعدسازی، الکتروپوریشن و غربالگری لاکتوکوکوس لاکتیس نوترکیب: به منظور تهیه‌ی سلول‌های پذیرا، از باکتری گرم مثبت *لاکتوکوکوس لاکتیس* سویه PTCC1336 استفاده شد. با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز، شناسایی اولیه‌ی سویه‌ی *لاکتوکوکوس لاکتیس* انجام شد. مستعدسازی باکتری‌های

لاکتوکوکوس لاکتیس توسط دو محلول انجام پذیرفت. محلول اول حاوی ۲۰۰ میلی‌مولار سوکروز، ۷۰ میلی‌مولار EDTA و ۳۰۰ میلی‌مولار گلایسین و محلول دوم حاوی ۷ میلی‌مولار لاکتوز، ۷ میلی‌مولار کلرید کلسیم و ۹۰ میلی‌مولار کلرید منیزیم بود که در ۵۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت M17 براث حل شده، و به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده و در نهایت توسط فیلتر ۰/۲ استریل شد. جهت تهیه‌ی سلول پذیرا باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس*، باکتری به مدت ۲٤ ساعت در محیط M17 براث حاوی محلول ۱ کشت داده شد. انکوباسیون در شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷° C انجام شد تا میزان جذب نوری ٦۰۰ OD به ۰/٤ رسید. باکتری سانتریفیوژ و با محلول دوم، سه مرتبه شستشو شد و در نهایت در دمای ۸۰ – درجه‌ی سانتی گراد فریز شد. ٦ میکرولیتر از پلاسمید نوترکیب pNZ8148-Usp45 حامل ژن *BLS* با غلظت ۰/۲ میکروگرم/میکرولیتر و همچنین ٦ میکرولیتر وکتور pNZ8148 فاقد ژن *BLS* (با غلظت ۰/۲ میکروگرم/میکرولیتر) با استفاده از دستگاه الکتروپوریتور (BIO RAD Gene Pulser Xcell) و با ولتاژ ۲۵۰۰ ولت، آمپر ۲۵ میکروفاراد و مقاومت ۲۰۰ اهم به ٤۰۰ میکرولیتر سلول پذیرای *باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس* سویه PTCC1336 منتقل شدند. سوسپانسیون باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* فاقد وکتور به عنوان کنترل منفی و سوسپانسیون باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* حاوی وکتور نوترکیب به عنوان کنترل مثبت روی محیط M17Agar حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (۲۵ mg/µl) کشت داده شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ °C گرماگذاری شدند.

استخراج DNA از باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس و ردیابی BLS

استخراج DNA از *لاکتوکوکوس لاکتیس* نوترکیب از کشت ۱۸ ساعته در محیط GM17-Broth با استفاده از کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران) مطابق دستورالعمل کیت انجام شد. به منظور ردیابی ژن *BLS* در DNA استخراج شده از تکنیک PCR به همراه یک جفت پرایمر اختصاصی مکمل دو سر ژن استفاده شد. به منظور القای بیان ژن *BLS* در وکتور نوترکیب pNZ8148– Usp45-*BLS* به کشت فاز تصاعدی باکتری در محیط مایع M17 به میزان ۱۰g/mL ماده‌ی القاکننده نایسین اضافه و حدود دو تا سه ساعت گرمخانه گذاری شد. پس از طی شدن این زمان و رسیدن OD600 = ۱، باکتری با شرایط ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد، ٦۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس رسوب باکتری طی ۳ مرحله با PBS (Phosphate-buffered saline) شستشو داده شد. رسوب باکتری در PBS حل و توسط امواج اولتراسونیک تجزیه گردید. به منظور ردیابی بیان ژن *BLS* در سطح RNA از روش Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) استفاده شد. در این روش ابتدا RNA با استفاده کیت استخراج RNA (یکتا تجهیز آزما، ایران) و بر اساس دستور کار شرکت سازنده به دست آمد. به منظور حذف آلودگی DNA، از DNaseI (یکتا تجهیز آزما، ایران) استفاده شد. همه‌ی نمونه‌های RNA تا زمان استفاده برای RT-PCR در فریزر ۷۰- نگه‌داری شدند. با استفاده از کیت سنتز cDNA (یکتا تجهیز آزما، ایران)، cDNA سنتز گردید. در نهایت با استفاده از cDNA سنتز شده به عنوان الگو و پرایمرهای اختصاصی طراحی شده، واکنش PCR طبق برنامه‌ی دمایی اشاره شده در ذیل صورت گرفت.

تأیید بیان پروتئین BLS به روش SDS-PAGE

جهت بررسی محصول ژن *BLS* کلون شده در وکتور بیانی مبتنی بر نایسین pNZ8148 موجود در باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* از روش الکتروفورز روی ژل عمودی SDS-PAGE با سیستم بافری Tris-SDS-Glycine استفاده شد. حضور سیگنال پپتید Usp45 در وکتور نوترکیب، منجر به ترشح وکتور بیانی نوترکیب در رسوب و سوپرناتانت باکتری می‌شود. لذا از رسوب و سوپرناتانت باکتری کشت شده در M17 broth+0.5% Glucose (GM17 Broth) و القاء شده توسط نایسین به منظور ارزیابی پروتئین BLS استفاده شد. رسوب و سوپرناتانت باکتری با بافر بارگیری نمونه مخلوط گردید و در ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵–۱۰ دقیقه جوشانده شد. سوسپانسیون رسوب و سوپرناتانت حاصل با سرنگ همیلتون به چاهک‌های ژل وارد شد. سپس پروتئین‌ها با استفاده از ولتاژی معادل ۲۰۰ ولت طی مدت زمان ۳ ساعت به وسیله‌ی الکتروفورز از یکدیگر جدا شدند. در نهایت ژل با استفاده از رنگ Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma-Aldrich، آلمان) رنگ‌آمیزی شده و با استفاده از دستگاه، عکس‌برداری شد.

این مقاله توسط کمیته‌ی تحقیقات اخلاقی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد با شماره IR.IAU.SHK.REC.1401.004 تأیید شده است.

یافته‌ها

پیش‌بینی آنتی‌ژنیسیته، سمیت و حساسیت‌زایی پروتئین BLS

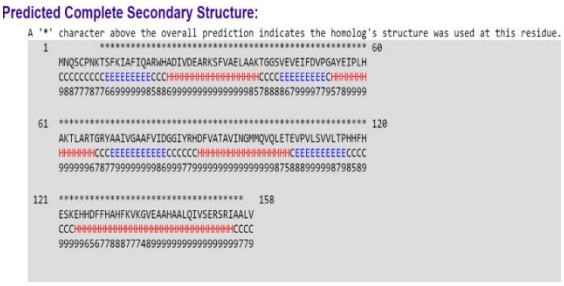
نتایج حاصل از پیش‌بینی آنتی‌ژنسیته، سمیت و حساسیت‌زایی پروتئین BLS در جدول ٤ گزارش شده است. پس از استخراج توالی پروتئین BLS از پایگاه داده‌ی NCBI، با استفاده از نرم‌افزار Vaxijen میزان آنتی‌ژنیسیته پروتئین هدف ۰/۵۲۸۲ با حد آستانه ۰/۵ گزارش شد. همچنین نتایج حاصل از بررسی سمیت و حساسیت‌زایی این پروتئین با استفاده از نرم‌افزارهای ToxinPred و AllergenFP v.1.0 نشان داد که پروتئین BLS غیرسمی و غیر آلرژی‌زا می‌باشد.

جدول ٤. پیش‌بینی آنتی‌ژنیسیته، حساسیت‌زایی و سمیت پروتئین *BLS*

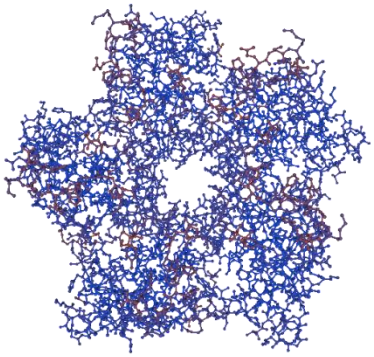
نام پروتئین	کد دسترسی	آنتی ژنیسیته	سمیت	حساسیت‌زایی
بروسلا لومازین سنتاز	Q2YKV1	۰/۵۸۸۲ آنتی‌ژن	غیر سمی	غیر حساسیت‌زا

ساختار دوم و سوم پروتئین BLS به ترتیب از پایگاه داده‌ی PROTEUS2 و SWISS-MODEL استخراج شد (شکل ۲).

الف



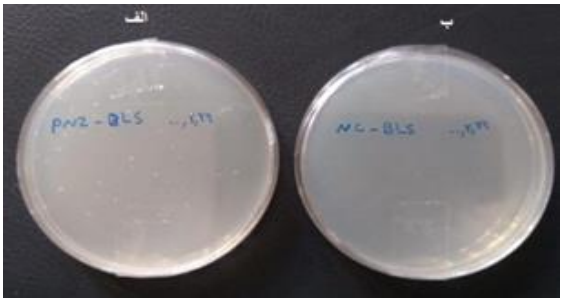
ب



شکل ۲. تصویر شماتیک ساختار دوم و سوم پروتئین BLS. الف) ساختار دوم پروتئین BLS استخراج شده از پایگاه داده‌ی PROTEUS2. ب) ساختار سوم پروتئین BLS استخراج شده از نرم‌افزار SWISS-MODEL.

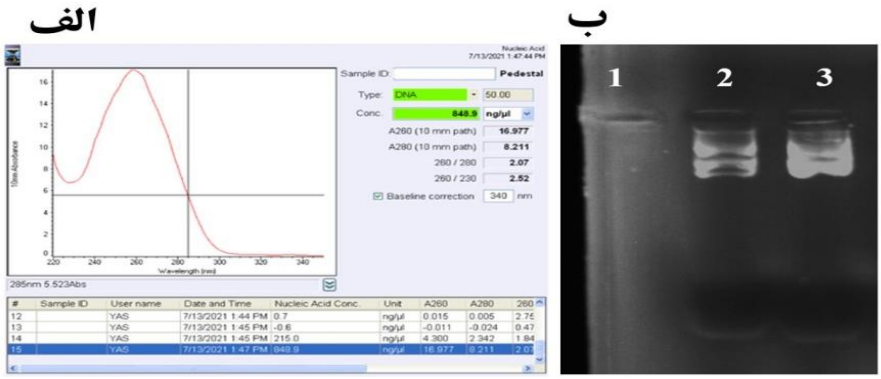
تأیید صحت وکتور نوترکیب pNZ8148 - Usp45- BLS به منظور تأیید صحت کلونینگ انجام شده و تأیید حضور ژن *BLS* در وکتور pNZ8148 با کمک پرایمرهای اختصاصی ژن مورد نظر، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز صورت پذیرفت. محصولات مربوطه روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند. در شکل ۱ پ حضور باند ٤٧٧ جفت بازی حاکی از موفقیت در کلونینگ ژن *BLS* می‌باشد. همچنین هضم آنزیمی دوگانه بر روی وکتور نوترکیب pNZ8148 - Usp45-*BLS* توسط شرکت GENEray انجام شد و تصویر ژل الکتروفورز برای ما ارسال گردید. مشاهده‌ی قطعه‌ی ژنیBLS با طولی برابر ٤٧٧ جفت باز و قطعه‌ی پلاسمید pNZ8148 - Usp45 فاقد قطعه‌ی ژنی BLS با طول ۲۹۹۷ جفت باز، کلون‌سازی قطعه‌ی ژنی *BLS* تأیید شد (شکل ۱ت). توالی یابی وکتور نوترکیب pNZ8148-Usp45-*BLS* توسط شرکت GENEray انجام و ارسال شد (شکل ۱ الف).

ترانسفورماسیون اشرشیاکلی سویه‌ی Top10F با وکتور نوترکیب pNZ8148 - Usp45- BLS پس از کلون نمودن قطعه‌ی ژنی مورد نظر درون وکتور pNZ8148 و سپس ترانسفورماسیون درون باکتری مستعد *اشرشیاکلی* سویه‌ی Top10F، صحت ترانسفورماسیون انجام شده در *اشرشیاکلی* سویه‌ی Top10F با مقایسه‌ی رشد کلنی‌های الحاق یافته با pNZ8148 بر روی محیط LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل، به عنوان نمونه کنترل مثبت تأیید شد (شکل ۳). از کشت باکتری‌های *اشرشیاکلی* سویه‌ی TOP10F ترانسفورم نشده و فاقد وکتور بر روی محیط LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل، به عنوان کنترل منفی استفاده شد که عدم رشد این باکتری‌ها نشانگر عدم مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل بود.



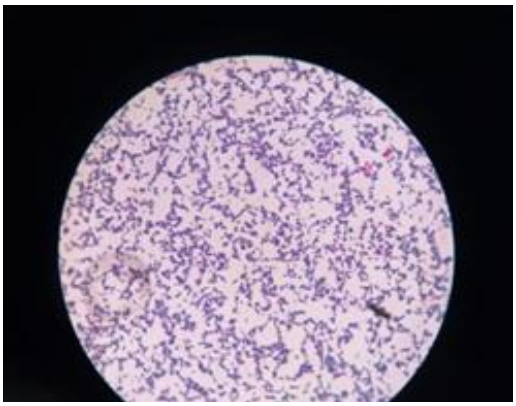
شکل ۳. تأیید ترانسفورماسیون وکتور *BLS*- Usp45 - pNZ8148. الف) کلنی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب بر روی محیط LB آگار حاوی کلرامفنیکل نشان از موفقیت ترانسفورماسیون می‌باشد. ب) کنترل منفی. عدم رشد باکتری *اشرشیاکلی* ترانسفورم نشده و فاقد وکتور روی محیط LB آگار حاوی کلرامفنیکل

استخراج و تخلیص pNZ8148-Usp45-BLS با کیت ستونی Favorgene پس از استخراج وکتور نوترکیب pNZ8148 - Usp45- *BLS* موجود در باکتری *اشرشیاکلی* سویه‌ی Top10F با استفاده از کیت استخراج پلاسمید، کیفیت و کمیت آن به ترتیب توسط ژل الکتروفورز و دستگاه نانودراپ بررسی شد. در بررسی انجام شده توسط دستگاه نانودراپ غلظت پلاسمید استخراج شده ۸٤۹/۹ ng/µl و درجه خلوص ۲/۰۷ برآورد شد (شکل ٤ الف). همچنین مشاهده‌ی قطعه‌ی ژنی ۳٤۷٤ جفت بازی متعلق به پلاسمید pNZ8148 - Usp45- *BLS* بر روی ژل آگارز ۱ درصد حاکی از موفقیت در استخراج پلاسمید بود (شکل ٤ ب).



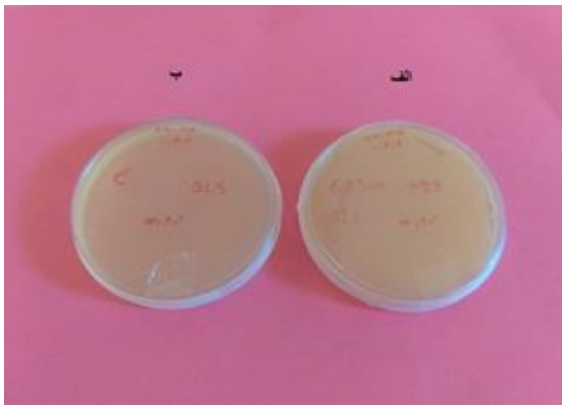
شکل ٤. تعیین کیفیت و کمیت پلاسمید استخراج شدع از اشرشیاکلی سویه Top10F توسط ژل الکتروفورز و دستگاه نانودراپ.
الف) غلظت وکتور نوترکیب استخراج شده از اشرشیاکلی سویه Top10F، ۸٤۹/۹ نانوگرم/میکرولیتر و میزان خلوص آن ۲/۰۷ اندازه‌گیری شد.
ب) تشکیل باند ۳٤۷٤ جفت بازی مربوط به وکتور pNZ8148 - Usp45- BLS. لاین ۱) کنترل منفی، لاین ۲) مشاهده‌ی قطعه‌ی ژنی ۲۹۹۷فاقد ژن هدف، لاین ۳) مشاهده‌ی قطعه‌ی ژنی ۳٤۷٤ متعلق به وکتور pNZ8148 - Usp45- BLS.

شناسایی و تایید لاکتوکوکوس لاکتیس: به منظور شناسایی و تایید سویه *لاکتوکوکوس لاکتیس* و خالص‌سازی آن، باکتری مورد نظر چندین بار بر روی محیط M17 اگار رشد داده شد. سویه مورد نظر به لحاظ مورفولوژی و با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم مورد شناسایی اولیه قرار گرفت. همچنین تست کاتالاز به منظور شناسایی *لاکتوکوکوس لاکتیس* انجام پذیرفت. براساس ویژگی‌های مورفولوژیکی و پس از انجام رنگ‌آمیزی گرم کوکسی‌های بنفش رنگ *لاکتوکوکوس لاکتیس* در زیر میکروسکوپ مشاهده و تایید شدند (شکل ٥). عدم مشاهده حباب در تست کاتالاز نشان دهنده‌ی عدم وجود این آنزیم در باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* می‌باشد از این‌رو نمی‌تواند پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تبدیل نماید.



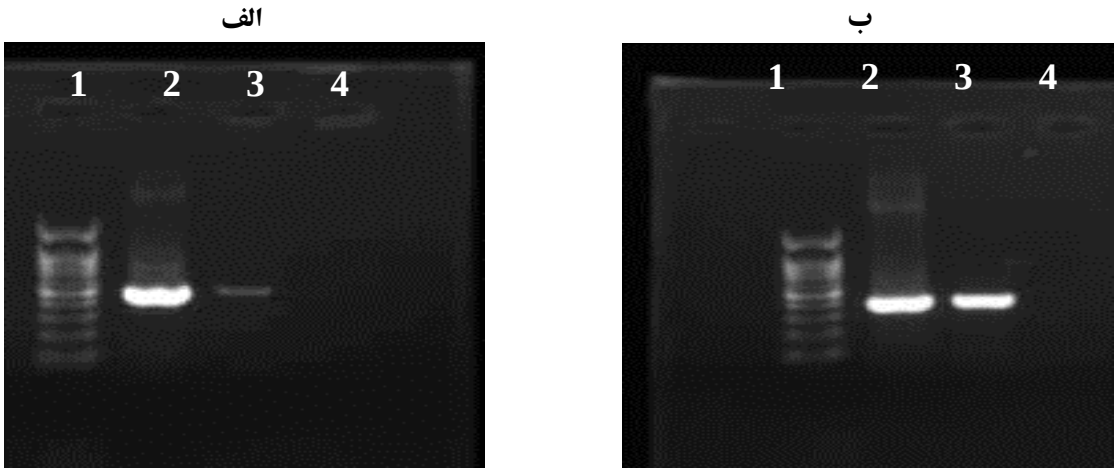
شکل ٥. تصویر میکروسکوپیک سویه‌ی *لاکتوکوکوس لاکتیس* که توسط رنگ‌آمیزی گرم با بزرگ‌نمایی ۱۰۰x تهیه شدند.

تأیید ترانسفورماسیون لاکتوکوکوس لاکتیس: پس از تنظیم واکنش الحاق قطعه ژنی *BLS* درون وکتور بیانی pNZ8148، بر اساس شدت باندهای استخراج شده و همچنین ارزیابی غلظت وکتور مورد نظر، الکتروپوریشن سلول شایسته *لاکتوکوکوس لاکتیس* با وکتور نوترکیب دارای قطعه‌ی مورد نظر انجام شد. وکتور نوترکیب pNZ8148 - Usp45- *BLS* به دلیل داشتن ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل، توانایی رشد در محیط M17 آگار حاوی کلرامفنیکل با غلظت ۲۵ میلی‌گرم/ میکرولیتر دارا می‌باشد. لذا رشد باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* بر روی این محیط حاکی از انتقال صحیح وکتور نوترکیب می‌باشد. رشد باکتری‌های فاقد وکتور (کنترل منفی) روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل مشاهده نشد (شکل ٦).



شکل ٦. تأیید ترانسفورماسیون *لاکتوکوکوس لاکتیس*. الف) رشد باکتری ترانسفورم شده *لاکتوکوکوس لاکتیس* در محیط حاوی کلرامفنیکل. ب) کنترل منفی.

تأیید حضور وکتور نوترکیب pNZ8148 - Usp45- BLS در لاکتوکوکوس لاکتیس: الف) PCR: به منظور اطمینان از وجود پلاسمید نوترکیب pNZ8148 حاوی قطعه‌ی ژنی *BLS* درون باکتری



شکل ۷. تأیید حضور وکتور نوترکیب pNZ8148 - Usp45- *BLS* در *لاکتوکوکوس لاکتیس* با دو روش PCR و RT-PCR. الف) مشاهده‌ی باند ٤٧٧ جفت بازی به روش PCR نشان‌دهنده‌ی موفقیت ترانسفورماسیون *لاکتوکوکوس لاکتیس* می‌باشد. لاین ۱) نشانگر (سینا ژن، ایران) ۱۰۰ جفت بازی، لاین ۲) تکرار اول از قطعه‌ی ٤٧٧ جفت بازی *BLS*، لاین۳) تکرار دوم از قطعه‌ی ژنی ٤٧٧ جفت بازی، لاین ٤) *لاکتوکوکوس لاکتیس* ترانسفورم شده با وکتور فاقد ژن هدف. ب) نتایج حاصل از انجام RT-PCR و تأیید بیان ژن در سطح RNA. لاین ۱) نشانگر (سینا ژن، ایران) ۱۰۰ جفت بازی، لاین ۲و ۳) تکرار اول و دوم قطعه‌ی ژنی BLS و طول ٤٧٧ جفت باز. لاین ٤) *لاکتوکوکوس لاکتیس* ترانسفورم شده با وکتور فاقد ژن *BLS*.

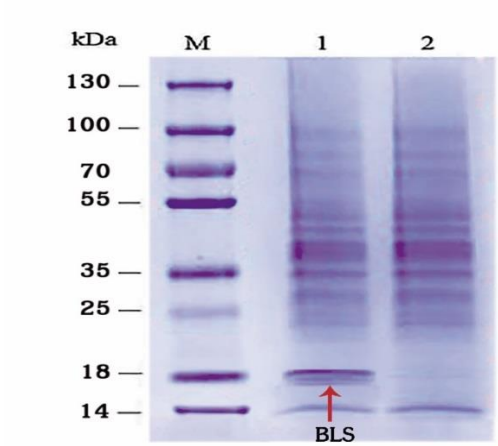
لاکتوکوکوس لاکتیس از تکنیک PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد. شکل ۷ الف، نتیجه‌ی PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بر روی کلنی‌های به دست آمده از ترانسفورماسیون را نشان می‌دهد. مشاهده باند ٤٧٧ جفت بازی حاصل از الکتروفورز روی ژل اگارز، نشان دهنده‌ی وجود ژن *BLS* می‌باشد. در باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* ترانسفورم شده با pNZ8148 هیچ گونه باندی مشاهده نگردید.

ب) RT-PCR برای تأیید بیان ژن در سطح RNA انجام گرفت. نتیجه RT-PCR، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *BLS*، مشاهده‌ی باند ٤٧٧ bp روی ژل بود (شکل ۷ ب).

تأیید پروتئین BLS به روش SDS-PAGE: در نهایت با استفاده از تکنیک SDS-PAGE نمونه‌ی پروتئینی استخراج شده از رسوب سلول باکتری بیان‌کننده‌ی پروتئین *BLS* مورد ارزیابی قرار گرفت. شکل ۸ نتیجه‌ی حاصل از الکتروفورز نمونه‌ی پروتئین استخراج شده از سلول باکتری بر روی ژل پلی آکریلآمید را نشان می‌دهد. حضور باند ۱۸ کیلو دالتونی نشانه‌ی حضور پروتئین *BLS* می‌باشد. لذا باکتری ترانسفورم شده با pNZ8148-Usp45-*BLS*، دارای یک باند پروتئینی ۱۸ کیلودالتونی اضافه نسبت به باکتری ترانسفورم نشده است در حالی که باکتری‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* ترانسفورم نشده فاقد این باند پروتئینی می‌باشند.

بحث

در این مطالعه، باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* به عنوان میزبانی ایمن و مناسب جهت کلون نمودن ژن *BLS* باکتری *بروسلا آبورتوس* مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۸ الکتروفورز مخلوط پروتئینی حاصل از لیز باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* نوترکیب با روش SDS-PAGE و ردیابی پروتئین *BLS* بیان شده در رسوب باکتریایی *لاکتوکوکوس لاکتیس* نوترکیب. لاین ۱) باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب pNZ8148 - Usp45- *BLS*، لاین ۲) باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* ترانسفورم شده با وکتور فاقد ژن هدف که پروتئین هدف را بیان ننموده، لاین M) مربوط به نشانگر (سینا ژن، ایران) می‌باشد.

در این پژوهش پس از تأیید کلونینگ قطعه‌ی ژنی مورد نظر درون وکتور pNZ8148 ترانسفورماسیون باکتری *اشرشیاکلی* سویه‌ی Top10 F با موفقیت انجام پذیرفت. پس از آن، با تکیه بر تکنیک

الکتروپوریشین ترانسفورماسیون پیروزمندانه *لاکتوکوکوس لاکتیس* با وکتور نوترکیب pNZ8148-Usp45-BLS انجام شد. ضمن تأیید حضور وکتور نوترکیب در کلنی *لاکتوکوکوس لاکتیس* به روش PCR، بیان موفقیت‌آمیز ژن *BLS* در سطح RNA و پروتئین به کمک تکنیک RT-PCR و SDS-PAGE تأیید و ارزیابی شد.

سیستم انتقال، یک فاکتور کلیدی جهت ورود پلاسمید به درون سلول و عبور از غشای هسته می‌باشد. در طی چند سال اخیر تحقیقات گسترده‌ای به منظور یافتن راهی مناسب جهت رویارویی با این باکتری صورت پذیرفته است که برخی از این تحقیقات در زمینه‌ی واکسن ژنی می‌باشد. در مطالعه‌ی محمودی و دوستی اشاره شد که استفاده از DNA پلاسمیدی کد کننده‌ی پروتئین‌های ایمونوژن منجر به تزریق مستقیم آنتی‌ژن به سلول‌های گیرنده میزبان می‌شود (۱۲). لذا سلول‌ها DNA را برداشت نموده و آنتی‌ژن پروتئینی کد شده توسط آن را بیان می‌نمایند که منجر به برانگیختن هر دو نوع ایمنی هومورال و سلولار می‌گردد (۱۲).

اخیراً استفاده از دستگاه‌هایی مانند الکتروپوریشن و جت انژکتورها جهت تحویل DNA پلاسمیدی نوید بخش بوده است (۱۳). همچنین سابقاً مطالعات در طراحی واکسن‌های نوترکیب مبتنی بر حامل‌های زنده، به باکتری‌های *سالمونلا تیفی موریوم*، *یرسینیا انتروکولیتیکا*، *ویبریو کلرا* و *اشرشیاکلی* محدود می‌گشت (۱٤). از این‌رو در این مطالعه واکسن حامل مخاطی با استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان حاملی غیربیماری‌زا و بی‌خطر علیه بروسلوز معرفی می‌گردد. عفونت *بروسلا* غالباً از طریق سطوح مخاطی رخ می‌دهد، لذا گسترش واکسن‌های مخاطی به منظور کنترل بروسلوز درمحل ورود پاتوژن مفید می‌باشد (۱۵).

Yousefi و همکاران در مطالعه‌ی خود به منظور طراحی و تولید واکسنی کارآمد علیه بروسلوز از *Omp25* و *BLS* *بروسلا ملی تنسیس* جهت پیش‌بینی اپی‌توپ و کلون‌سازی آن‌ها استفاده نمودند (۵). بدین منظور قطعه‌ی ژنی *BLS* و *Omp25* درون وکتور pTZ57R/T کلون شد. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک از ژن‌های توالی‌یابی شده نشان دادند که هر دو ژن در گونه‌های مختلف *بروسلا* تقریباً مشابه می‌باشند. ارزیابی پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی در برابر عفونت *بروسلا ملیتنسیس* در موش‌ها، این آنتی‌ژن را به عنوان کاندید مناسبی برای واکسن های نوترکیب زیرواحدی علیه تب مالت مطرح نمود (۵). همانند سایر پاتوژن‌های درون سلولی اختیاری، مقاومت به *بروسلا* به القاء مؤثر ایمنی سلولی (Cell mediated immunity) CMI بستگی دارد. به طور خاص، پاسخ‌های ایمنی Th1 که با تولید اینترفرون گاما (IFN-γ) مشخص می‌شوند، با ایمنی محافظتی نسبت به *بروسلا* مرتبط هستند (۱٦). لذا استراتژی‌های فعلی جهت توسعه‌ی واکسن‌های نسل جدید در برابر بروسلوز بر اساس انتخاب آنتی‌ژن‌هایی می‌باشد که قادر به برانگیختن پاسخ ایمنی سلولی هستند.

مطالعات انجام شده توسط Velikovsky و همکاران نشان داد که *BLS* می‌تواند نامزد مفیدی برای توسعه واکسن‌های زیرواحدی علیه بروسلوز باشد، زیرا یک پاسخ سلولی خاص آنتی‌ژن را با تولید IFN-γ و محافظت، مستقل از ادجوانت ایجاد می‌نماید (۱۷).

Zhao و همکاران طی مطالعه‌ی خود از سویه‌های ضعیف شده‌ی *سالمونلا تیفی موریوم* جهت بیان و ارائه‌ی آنتی‌ژن *BLS*، به منظور غلبه بر عفونت *بروسلا* استفاده نمودند. در این مطالعه پلاسمید حاوی قطعه‌ی ژنی *BLS* که درون باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* کلون گشته بود، توانست آنتی‌ژن را برای بیان در سلول‌های یوکاریوتی هدف تحویل دهد. نتایج حاصل از پژوهش آنان نشان داد که تجویز خوراکی این واکسن به مدل‌های آزمایشگاهی توانایی برانگیختن هر دو نوع ایمنی مخاطی و سیستمیک علیه عفونت با *بروسلا آبورتوس* ٥٤٤ را دارا می‌باشد (۱۸).

از این‌رو با توجه به مطالعات پیشین، در این پژوهش پروتئین ۱۸ کیلودالتونی BLS *بروسلا آبورتوس*، به دلیل ایمونوژن بودن به عنوان کاندیدی مناسب جهت تولید واکسن مؤثر علیه تب مالت انتخاب شد. Leya و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان دادند که واکسن مشتق شده از چهار آنتی‌ژن هترولوگ *بروسلا* (BLS، پرولین راسماز زیر واحد A، Omp19 و Cu-Zn/SOD) مبتنی بر سیستم تحویل *سالمونلا تیفی موریوم* می‌تواند یک پاسخ ایمنی محافظتی علیه عفونت با *بروسلا آبورتوس* القاء نماید (۱۹).

از ویژگی‌های مهم *لاکتوکوکوس لاکتیس* به عنوان حامل آنتی‌ژن در واکسیناسیون می‌توان به غیر بیماری‌زا بودن با توجه به استفاده‌ی طولانی مدت آن‌ها در صنایع غذایی، غیرتهاجمی بودن، عدم کلونیزاسیون در دستگاه گوارش و تحمل شرایط اسیدی اشاره نمود (۲۰). طی استفاده‌ی دهانی این واکسن، میکروارگانیسم‌های حاوی پلاسمید نوترکیب توسط سلول‌های M پلاک‌های پیر برداشت شده و به دنبال آن به سلول‌های دندرتیک عرضه کننده‌ی آنتی‌ژن تحویل داده می‌شوند. تحویل اپی‌توپ‌های فرآوری شده توسط سلول‌های عرضه کننده به سلول‌های Th1 منجر به القاء پاسخ سیستم ایمنی می‌گردد (۲۱). از آن‌جایی که این باکتری قادر به کلونیزاسیون در دستگاه گوارش نمی‌باشد و به مخاط سیستم گوارشی تهاجم نمی‌کند، لذا تولید واکسن مبتنی بر آن به منظور مصرف دهانی نسبت به سایر میکروارگانیسم‌ها نظیر *سالمونلا تیفی موریوم* و *ویبریوکلرا* دارای برتری می‌باشد. به علاوه، واکسن‌های مخاطی می‌توانند IgG سرم و IgA ترشحی را جهت خنثی نمودن سموم و ویروس‌ها تحریک کرده و سبب القای فعالیت‌های سلول‌های T سیتولیتیک شوند (۲۱). ایمونوگلوبولین IgA ترشحی خط دفاعی اولیه هنگام محافظت

سلول‌های پوششی روده در مقابل سموم روده‌ای و میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا محسوب می‌شود (۲۱).

Rezaei و همکاران، مطالعه‌ای را با هدف معرفی *لاکتوکوکوس لاکتیس* نوترکیب تولیدکننده‌ی پروتئین Omp16 از *بروسلا ملی تنسیس* و IL-12 انسانی به عنوان یک واکسن زنده‌ی مخاطی بی‌خطر طراحی نمودند. نتایج حاصل از مطالعه‌ی آنان پس از تجویز خوراکی واکسن تولید شده به مدل‌های آزمایشگاهی نشان دهنده‌ی افزایش تیتر آنتی‌بادی IgG بود (۲۲).

همچنین در راستای پژوهش صورت گرفته، Mohammadi و Golchin در سال ۲۰۲۰، در ابتدا قطعه‌ی ژنی *Omp19* را درون وکتور بیانی pT1NX کلون نموده و سپس با استفاده از تکنیک الکتروپوریشن به درون باکتری *لاکتوکوکوس کازئی* منتقل کردند. نتایج ثبت شده از پژوهش آنان نشان داد که موش‌های دریافت‌کننده‌ی *لاکتوکوکوس کازئی* حاوی پلاسمید نوترکیب، پاسخ مخاطی بسیاری خوبی را علیه چالش با *بروسلا آبورتوس* ۵۴۴ نشان دادند (۲۳).

Sáez و همکاران، از *لاکتوکوکوس لاکتیس* به عنوان حامل در طراحی واکسن، حاملی علیه بروسلوز استفاده نمودند. توسعه‌ی واکسن‌های مخاطی برای کنترل بروسلوز می‌تواند سازنده باشد. لذا در این پژوهش از *لاکتوکوکوس لاکتیس* ترشح‌کننده‌ی سوپر اکسید دسموتاز *بروسلا آبورتوس* و IL12 به عنوان واکسن خوراکی در موش‌ها استفاده کردند. نتایج حاصل از پژوهش آنان نشان داد که طراحی واکسن بر اساس حاملین زنده مشتق از *لاکتوکوکوس لاکتیس* بر علیه عفونت‌های *بروسلا آبورتوس* امیدوارکننده می‌باشد (۲۴).

نتیجه‌گیری

در این پژوهش در ابتدا قطعه‌ی ژنی *BLS* با استفاده از تکنیک PCR تکثیر گشت. پس از آن وکتور pNZ8148-USP45-*BLS* سنتز و با استفاده از تکنیک هضم آنزیمی، توالی‌یابی و الکتروفورز تأیید شد. در نهایت انتقال موفقیت‌آمیز وکتور نوترکیب pNZ8148-Usp45-*BLS* به باکتری پروبیوتیک *لاکتوکوکوس لاکتیس* به کمک تکنیک الکتروپوریشن انجام گشت. امروزه توسعه‌ی نسل جدیدی از واکسن‌های بروسلوز به دلیل هزینه‌های اقتصادی و بیوتروریسم بالقوه یک نیاز فوری می‌باشد. اما با وجود پیشرفت‌های خوش‌بینانه در دهه‌های گذشته در حوزه‌ی تحقیقات واکسن، هنوز هیچ واکسن تجاری یا درمان مؤثری برای بروسلوز انسانی وجود ندارد. با توجه به ویژگی‌های ذکر شده، وکتورهای مبتنی بر باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توانند جایگزین مناسبی برای واکسن‌های زنده‌ی ضعیف شده باشند. با توجه به بیان پروتئین *BLS* توسط *لاکتوکوکوس لاکتیس*، پیش‌بینی می‌شود که تجویز خوراکی این واکسن می تواند ایمنی هومورال و سلولی را به خوبی برانگیخته نماید و کاندیدای پیشگیری از بیماری بروسلوز باشد. با این وجود به منظور غلبه بر محدودیت‌های این پژوهش، مطالعات گسترده‌تری در شرایط in vitro و in vivo مورد نیاز می‌باشد. لذا از جمله اهداف پیش‌رو به کار گیری واکسن خوراکی *لاکتوکوکوس لاکتیس* بیان‌کننده‌ی پروتئین *BLS* در مدل‌های حیوانی است.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر، حاصل بخشی از پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکتری رشته ژنتیک مولکولی می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به انجام رسیده است. بدین وسیله از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، معاونت محترم پژوهشی دانشگاه و کمیته اخلاق برای مساعدت در تصویب و اجرای این طرح تحقیقاتی صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایم.

References

1. Dadar M, Tiwari R, Sharun K, Dhama K. Importance of brucellosis control programs of livestock on the improvement of one health. Vet Q 2021; 41(1): 137-51.
2. Vitry MA, Hanot Mambres D, De Trez C, Akira S, Ryffel B, Letesson JJ, et al. Humoral immunity and CD4+ Th1 cells are both necessary for a fully protective immune response upon secondary infection with Brucella melitensis. J Immunol 2014; 192(8): 3740-52.
3. Darbandi A, Koupaei M, Navidifar T, Shahroodian S, Heidary M, Talebi M. Brucellosis control methods with an emphasis on vaccination: a systematic review. Expert Rev Anti Infect Ther 2022; 20(7): 1025-35.
4. Shirdast H, Ebrahimzadeh F, Taromchi AH, Mortazavi Y, Esmaeilzadeh A, Sekhavati MH, et al. Recombinant Lactococcus lactis displaying Omp31 antigen of Brucella melitensis can induce an immunogenic response in BALB/c mice. Probiotics Antimicrob Proteins 2021; 13(1): 80-9.
5. Yousefi S, Abbassi-Daloii T, Sekhavati MH, Tahmoorespur M. Evaluation of immune responses induced by polymeric OMP25-BLS Brucella antigen. Microb Pathog 2018; 115: 50-6.
6. Velikovsky CA, Cassataro J, Giambartolomei GH, Goldbaum FA, Estein S, Bowden RA, et al. A DNA vaccine encoding lumazine synthase from Brucella abortus induces protective immunity in BALB/c mice. Infect Immun 2002; 70(5): 2507-11.
7. Skwarczynski M, Toth I. Non-invasive mucosal vaccine delivery: advantages, challenges and the future. Expert Opin Drug Deliv 2020; 17(4): 435-7.
8. Rueckert C, Guzmán CA. Vaccines: From empirical development to rational design. PLoS Pathog 2012;

8(11): e1003001.
9. Szatraj K, Szczepankowska AK, Chmielewska-Jeznach M. Lactic acid bacteria - promising vaccine vectors: possibilities, limitations, doubts. J Appl Microbiol 2017; 123(2): 325-39.
10. de Castro CP, Drumond MM, Batista VL, Nunes A, Mancha-Agresti P, Azevedo V. Vector development timeline for mucosal vaccination and treatment of disease using Lactococcus lactis and design approaches of next generation food grade plasmids. Front Microbiol 2018; 9: 1805.
11. Cohen SN, Chang ACY, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 1972; 69(8): 2110-4.
12. Mahmoudi Vashian Z, Doosti Z. Cloning and gene expression of ureG gene as a DNA vaccine candidate against helicobacter pylori [in Persian]. J Guilan Univ Med Sci 2017; 26(102): 20-9.
13. Al-Dosari MS, Gao X. Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. AAPS 2009; 11(4): 671.
14. da Silva AJ, Zangirolami TC, Novo-Mansur MTM, de Campos Giordano R, Martins EAL. Live bacterial vaccine vectors: an overview. Braz J Microbiol 2014; 45(4): 1117-29.
15. Pasquevich KA, Ibañez AE, Coria LM, García Samartino C, Estein SM, Zwerdling A, et al. An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against B. abortus mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice. PLoS One 2011; 6(1): e16203.
16. Sanakkayala N, Sokolovska A, Gulani J, HogenEsch H, Sriranganathan N, Boyle SM, et al. Induction of antigen-specific Th1-type immune responses by gamma-irradiated recombinantBrucella abortusRB51. Clin Vaccine Immunol 2005; 12(12): 1429-36.
17. Velikovsky CA, Goldbaum FA, Cassataro J, Estein S, Bowden RA, Bruno L, et al. Brucellalumazine synthase elicits a mixed Th1-Th2 immune response and reduces infection in mice challenged withBrucella abortus544 independently of the adjuvant formulation used. Infect Immun 2003; 71(10): 5750-5.
18. Zhao Z, Li M, Luo D, Xing L, Wu S, Duan Y, et al. Protection of mice from Brucella infection by immunization with attenuated Salmonella enterica serovar typhimurium expressing A L7/L12 and BLS fusion antigen of Brucella. Vaccine 2009; 27(38): 5214-9.
19. Leya M, Kim WK, Cho JS, Yu EC, Kim YJ, Yeo Y, et al. Vaccination of goats with a combinationSalmonellavector expressing fourBrucellaantigens (BLS, PrpA, Omp19, and SOD) confers protection againstBrucella abortusinfection. J Vet Sci 2018; 19(5): 643-52.
20. Rezaei M, Rabbani Khorasgani M, Aliramaei MR. Recombinant lactococcus, a new approach to oral vaccines [in Persian]. J Arak Univ Med Sci 2020, 23(6): 786-805.
21. Diaz-Dinamarca DA, Hernandez C, Escobar DF, Soto DA, Muñoz GA, Badilla JF, et al. Mucosal vaccination with Lactococcus lactis-secreting surface immunological protein induces humoral and cellular immune protection against group B Streptococcus in a Murine model. Vaccines (Basel) 2020; 8(2): 146.
22. Rezaei M, Rabbani-Khorasgani M, Zarkesh-Esfahani SH, Emamzadeh R, Abtahi H. Lactococcus-based vaccine against brucellosis: IgG immune response in mice with rOmp16-IL2 fusion protein. Arch Microbiol 2021; 203(5): 2591-6.
23. Mohammadi E, Golchin M. High protection of mice against Brucella abortus by oral immunization with recombinant probiotic Lactobacillus casei vector vaccine, expressing the outer membrane protein OMP19 of Brucella species. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2020; 70: 101470.
24. Sáez D, Fernández P, Rivera A, Andrews E, Oñate A. Oral immunization of mice with recombinant Lactococcus lactis expressing Cu, Zn superoxide dismutase of Brucella abortus triggers protective immunity. Vaccine 2012; 30(7): 1283-90.

DOI: *10.48305/jims.v41.i738.0872*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 41, No. 738, 2nd Week, December 2023**

Received: 21.01.2023 Accepted: 22.11.2023 Published: 05.12.2023

Design and Fabrication of a DNA Vaccine against *Brucella Abortus* based on recombinant *Lactococcus Lactis* that Expresses Lumazine Synthase Protein

Zahra Fatehi[1], Abbas Doosti[2], Mohammad Saeid Jami[1,3]

Original Article

Abstract

Background: Vaccination is an efficient and cost-effective way to control brucellosis. This study aims to generate recombinant *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) with *Brucella abortus* (*B. abortus*) BLS cytoplasmic protein.

Methods: The target vector, gene, and signal peptide (pNZ8148-Usp45-BLS) were developed and made in this study. Cloning accuracy was verified by PCR, enzyme digestion, and sequencing. Top10 F Escherichia coli was transformed using the recombinant expression vector. The column plasmid extraction kit selected and eliminated chloramphenicol-effected bacteria from an agar plate. In electroporation, Lactococcus lactis bacteria received the recombinant vector. Both SDS-PAGE and RT-PCR confirmed the transition.

Findings: To confirm the correctness of cloning and to confirm the presence of the *BLS* gene in the pNZ8148 vector, PCR and enzymatic digestion were performed. Observation of the *BLS* gene fragment with a length of 477 bp and plasmid pNZ8148 - Usp45 without the *BLS* gene fragment with a length of 2997 bp, the cloning of the *BLS* gene fragment was confirmed. Also, in the study conducted by the nanodrop device, the concentration of the extracted plasmid was estimated at 848.9 ng/µl and the degree of purity was 2.07. The results of RT-PCR indicated the success of the *BLS* gene transformation of *Brucella abortus* in *L. lactis* bacteria. Also, a single protein band of 18 kDa was observed in transformed *L. lactis*.

Conclusion: The present study showed that the *BLS* gene of the probiotic *L. lactis* transfected with pNZ8148-Usp45-*BLS* is expressed by electroporation.

Keywords: Brucellosis; DNA vaccine; *Lactococcus lactis;* Electroporation

Citation: Fatehi Z, Doosti A, Jami MS. **Design and Fabrication of a DNA Vaccine against *Brucella Abortus* based on recombinant *Lactococcus Lactis* that Expresses Lumazine Synthase Protein.** J Isfahan Med Sch 2023; 41(738): 872-83.

1- PhD Student, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2- Professor, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
3- Assistant Professor, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
Corresponding Author: Abbas Doosti, Professor, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran; Email: abbasdoosti@yahoo.com